

**PATENT APPLICATION**

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re the Application of:

Thierry DELPLANCHE et al.

Group Art Unit: 2776

Application No.: New U.S. Patent Application

Filed: April 14, 2000

Attorney Dkt. No.: 32143-156889

For: PROCESS FOR THE SEPARATION OF ENANTIOMERS AND ENANTIOPURE  
REAGENT

**CLAIM FOR PRIORITY**

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application filed in the following foreign country is hereby requested for the above-identified patent application and the priority provided in 35 U.S.C. §119 is hereby claimed:

**BELGIUM PATENT NO. 09900280 FILED APRIL 21, 1999 IN BELGIUM**

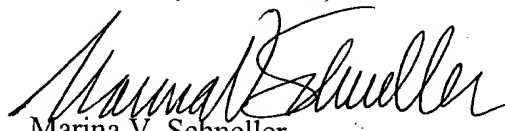
In support of this claim, a certified copy of said original foreign application:

  X   is filed herewith.

       Was filed on     in Parent Application No.     filed    .


It is requested that the file of this application be marked to indicate that the requirements of 35 U.S.C. §119 have been fulfilled and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of this document.

Respectfully submitted,

  
Marina V. Schneller  
Registration No. 26,032

VENABLE  
1201 New York Avenue, N.W.  
Suite 1000  
Washington, DC 20005-3917  
Telephone: (202) 962-4800  
Telefax : (202) 962-8300

Date: April 14, 2000

  
jc658 U.S. PTO  
09/549928  
04/14/00

# ROYAUME DE BELGIQUE



Il est certifié que les annexes à la présente sont la copie fidèle de documents accompagnant une demande de brevet d'invention tels que déposée en Belgique suivant les mentions figurant au procès-verbal de dépôt ci-joint.

Bruxelles, le 28. -3- 2000

Pour le Directeur de l'Office  
de la Propriété industrielle

Le fonctionnaire délégué,

BAILLEUX G.  
Conseiller adjoint



BEST AVAILABLE COPY



OFFICE DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE

PROCES-VERBAL DE DEPOT  
D'UNE DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

Nr : 09900280  
Aujourd'hui, le 21-4-1999 à 14 heures, 45 minutes,

M MOREAU

agissant en tant que ☐ Demandeur.  
☐ Employé du demandeur.  
☐ Employé d'un établissement effectif du demandeur.  
☐ Mandataire agréé.  
☒ Employé du mandataire agréé, M JACQUES Ph.  
☐ Avocat.

se présente à l'OFFICE DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE et y dépose une demande en vue d'obtenir un brevet  
d'invention relatif à PROCÉDE POUR LA SEPARATION D'ENANTIOMERES ET REACTIF  
ENANTIOPUR.

demandé par SOLVAY (Société Anonyme)  
Rue du Prince Albert, 33  
B 1050 BRUXELLES (Belgique)

La demande, telle que déposée, contient les documents nécessaires pour obtenir une date de dépôt conformément  
à l'article 16, paragraphe 1er, de la loi du 28 mars 1984 sur les brevets d'invention.

Le déposant,

Le fonctionnaire délégué,

C. BOLLAND  
INGENIEUR

Bruxelles, le 21-4-1999

Procédé pour la séparation d'énantiomères et réactif énantiopur

L'invention se rapporte à un procédé pour la séparation d'énantiomères et à des réactifs à base d'un aminoacide énantiopur, utilisables en séparation d'énantiomères.

La séparation d'énantiomères est une question de grande importance en  
5 industrie pharmaceutique, chimique et biotechnologique. En effet les deux  
énantiomères d'une substance chimique de constitution identique peuvent avoir  
des activités biologiques radicalement différentes. Il est ainsi souhaitable de  
disposer de réactifs et de techniques de séparation permettant de séparer les  
énantiomères et d'analyser la pureté énantiomérique des produits  
10 pharmaceutiques, chimiques et biotechnologiques.

Un article de Marfey, P., (Carlsberg Res. Comm. 49, 1984, 591-596)  
décrit un procédé de séparation d'énantiomères par RP-HPLC. Selon ce procédé  
connu, on met en oeuvre du 1-Fluoro-2,4-dinitrophényl-5-L-Alaninamide à titre  
de réactif pour la dérivation d'aminoacides. D'autres procédés similaires sont  
15 également connus. Le procédé et réactif décrits par Marfey ainsi que les autres  
procédés et réactifs présentent toutefois de nombreux inconvénients :

Le dérivé obtenu dans la réaction de l'acide amino avec le réactif doit être  
isolé par des opérations successives de neutralisation, de séchage, de  
redissolution et de filtration. Ces opérations demandent beaucoup de temps et  
20 sont donc peu intéressantes pour une application industrielle. De plus on risque,  
dans des cas d'applications analytiques, des erreurs dans les résultats d'analyse,  
causées par une solubilité différente des dérivés diastéréomériques dans le  
solvant de redissolution. Lorsqu'on effectue des analyses quantitatives à l'aide  
de la spectrométrie UV, on rencontre, dans le procédé connu, des difficultés dues  
25 à des différences de coefficient d'absorption des dérivés diastéréomériques.  
Enfin, le prix élevé du réactif rend souhaitable de trouver des alternatives.

L'invention vise à remédier à ces problèmes.

L'invention concerne dès lors un procédé pour la séparation  
d'énantiomères comprenant au moins un groupement fonctionnel libre dans  
30 lequel

- (a) on fait réagir un mélange comprenant les énantiomères en milieu basique avec un réactif à base d'un aminoacide énantiopur, réactif dans lequel au moins un groupement amino de l'acide porte un groupement activant pour former un précurseur actif d'un groupement isocyanate et dans lequel
- 5 au moins un groupement carboxyle de l'acide est substitué et
- (b) on soumet le mélange de diastéréomères obtenu à une opération de séparation.

Il a été trouvé, de manière surprenante, que le procédé selon l'invention permet d'obtenir de bons résultats en séparation d'énantiomères comprenant au

10 moins un groupement fonctionnel libre, notamment dans des applications analytiques quantitatives. Le procédé selon l'invention permet une dérivation et séparation d'énantiomères, rapides et sous des conditions souples et économiques.

L'invention concerne aussi un réactif à base d'un aminoacide énantiopur

15 dans lequel au moins un groupement amino de l'acide porte un groupement activant pour former un précurseur actif d'un groupement isocyanate et dans lequel au moins un groupement carboxyle de l'acide est substitué.

Par aminoacide on entend désigner, aux fins de la présente invention tout composé comprenant au moins un groupement  $\text{NH}_2$  et au moins un groupement

20 carboxyle. Les aminoacides utilisés dans la présente invention sont des aminoacides chiraux contenant au moins un carbone asymétrique. On peut mettre en oeuvre tout aminoacide chiral bien connu en lui-même, d'origine naturelle ou synthétique.

Des exemples de réactifs selon l'invention sont à base, par exemple, des

25 aminoacides naturels suivants :

Alanine, Valine, Norvaline, Leucine, Norleucine, Isoleucine, Sérine, Isosérine, Homosérine, Thréonine, Allothrénine, Méthionine, Ethionine, Acide Glutamique, Acide Aspartique, Asparagine, Cystéine, Cystine, Phénylalanine, Tyrosine, Tryptophane, Lysine, Arginine, Histidine, Ornithine, Glutamine et

30 Citrulline.

Les énantiomères non naturels sont également utilisables.

Des exemples d'acides d'origine synthétique utilisables comme base du réactif selon l'invention comprennent, par exemple, les acides

suivants :

35 (1-Naphtyl)alanine, (2-Naphtyl)alanine, Homophénylalanine, (4-Chlorophényl)alanine, (4-Fluorophényl)alanine, (3-Pyridyl)alanine,

Phénylglycine, Acide Diaminopimélique (Acide 2-6-Diaminoheptane-1,7-dioïque), Acide 2-aminobutyrique, Acide-2-aminotétraline-2-carboxylique, Erythro  $\beta$ -Méthylphenylalanine, Threo  $\beta$ -Méthylphenylalanine, (2-Méthoxyphenyl)alanine, Acide 1-amino-5-hydroxyindane-2-carboxylique, Acide  
5 2-Aminoheptane-1,7-dioïque, (2,6-Diméthyl-4-hydroxyphényl)alanine, Erythro  $\beta$ -Méthyltyrosine, Threo  $\beta$ -Méthyltyrosine.

Par aminoacide énantiopur on entend désigner un aminoacide chiral constitué essentiellement d'un énantiomère. L'excès énantiomérique (ee) est défini :  $ee(\%) = 100(x_1 - x_2)/(x_1 + x_2)$  avec  $x_1 > x_2$ ;  $x_1$  et  $x_2$  représentent la teneur du  
10 mélange en énantiomère 1 ou 2 respectivement.

On met généralement en oeuvre un aminoacide énantiopur dont l'excès énantiomérique est supérieur ou égal à 99%. On préfère un aminoacide énantiopur dont l'excès énantiomérique est supérieur ou égal à 99,5%. De manière particulièrement préférée on met en oeuvre un aminoacide énantiopur  
15 dont l'excès énantiomérique est supérieur ou égal à 99,9%.

Tout aminoacide énantiopur est utilisable comme base du réactif selon l'invention. De préférence l'acide énantiopur est sélectionné parmi les aminoacides d'origine naturelle ou synthétique nommés ci-dessus. Les aminoacides comprenant au moins un noyau aromatique tels que par exemple la  
20 phénylalanine ou ses dérivés conviennent bien à titre d'acide énantiopur. De façon particulièrement préférée, l'acide énantiopur est sélectionné parmi la phénylalanine, la (1-naphtyl)alanine, la (2-naphtyl)alanine ou le  $\alpha$  ou  $\beta$  tryptophane ((2-indolyl)alanine ou (3-indolyl)alanine), éventuellement substitués.

25 Dans le réactif selon l'invention, au moins un groupement amino de l'acide énantiopur porte un groupement activant pour former un précurseur actif d'un groupement isocyanate.

Par précurseur actif d'un groupement isocyanate, on entend désigner tout précurseur qui lorsqu'il est mis en oeuvre dans un solvant utilisable dans le  
30 procédé selon l'invention avec un équivalent de phénylalanine en présence de 1 équivalent de base réagit à une température inférieure ou égale à 35°C en une durée inférieure ou égale à 30 min essentiellement complètement, pour former l'urée correspondant. De préférence le précurseur réactif libère le groupement isocyanate à une température inférieure ou égale à 30°C en une durée inférieure  
35 ou égale à 15 min. De manière tout particulièrement préférée, le précurseur réactif libère le groupement isocyanate

à température ambiante en une durée inférieure ou égale à 10 min. Des conditions de test utilisables pour déterminer le précurseur actif sont décrites, par exemple dans l'exemple 3 plus bas.

Le groupement activant est généralement constitué d'un dérivé carbonyle  
5 lié à un substituant électronégatif. On peut par exemple utiliser à titre de groupement activant un groupement aryloxy-carbonyl, hétéroaryloxy-carbonyl, 1,3-imidazolyl-N-carbonyl ou 1,2,4-triazolyl-N-carbonyl. Parmi les groupes aryloxy-carbonyl conviennent bien ceux qui portent au moins un substituant -I, -M sur un noyau aromatique. Un substituant -I, -M est un groupement qui a un  
10 effet négatif inductif et de résonance comme défini en J. March, *Advanced Organic Chemistry*, 4. Ed., 1992, p.17-19, 273-275. Parmi les substituants -I, -M figurent, par exemple  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{SO}_2\text{R}$ ,  $-\text{SO}_2\text{OR}$ ,  $-\text{NR}_3^+$ ,  $\text{SR}_2^+$ . Les substituants se trouvent de préférence à au moins une des positions 2,4 ou 6 du noyau  
aromatique ou à des positions analogues aux positions 2 ou 4 dans des systèmes  
15 aromatiques condensés. On préfère utiliser un groupement activant aryloxy-carbonyl qui porte au moins un substituant nitro sur un noyau aromatique. Le groupement (4-nitrophényloxy)carbonyl est particulièrement préféré.

Dans le réactif selon l'invention, au moins un groupement carboxyle de  
20 l'acide est substitué.

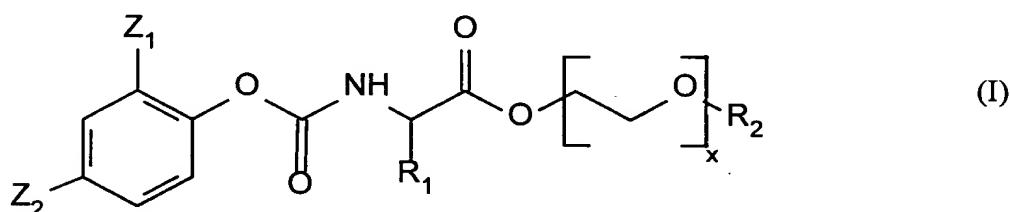
Généralement, le substituant par lequel le groupement carboxyle de l'acide est substitué ne comprend pas de groupement fonctionnel libre, susceptible de réagir avec le précurseur actif. Parmi les substituants utilisables figurent par exemple, les groupements alkyles comprenant de 1 à 4 atomes,  
25 linéaires ou ramifiés tels que le groupement méthyl, éthyl, n-propyl, i-propyl, n-butyl, i-butyl ou t-butyl, les éthers, les groupements aryle les groupements alkyle, éther ou aryle étant éventuellement fonctionnalisés par, par exemple, des halogènes, des esters carboxyliques, sulphoniques, des esters de sulfate, des esters phosphoniques, des esters de phosphate. Conviennent bien les substituants  
30 hydrophiles qui assurent une bonne solubilité du réactif dans des mélanges d'eau avec des solvants organiques.

Le substituant hydrophile assure généralement qu'une solution du réactif dans un mélange dioxane/eau 1 : 1 en volume est homogène à 20°C lorsque la concentration du réactif est d'au moins  $0.5 \cdot 10^{-3}$  mol/l. Souvent la concentration  
35 est d'au moins  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l. De préférence la concentration est d'au moins

0.5\*10<sup>-2</sup> mol/l. De bons substituants hydrophiles assurent que la solution est homogène à 20°C lorsque la concentration du réactif est d'au moins 1\*10<sup>-2</sup> mol/l.

On préfère mettre en oeuvre un substituant qui contient au moins une liaison éther. Des exemples de substituants contenant au moins une liaison éther sont, par exemple, les éthers d'alkyle ou d'aryle de mono- oligo- ou de polyalkylèneglycols tels que par exemple le mono- oligo ou polyéthylèneglycol ou le mono- oligo- ou polypropylèneglycol. Le substituant 2-méthoxyéthyl est particulièrement préféré.

Des variantes particulièrement préférées du réactif selon l'invention comprenant un substituant hydrophile répondent à la formule générale (I)

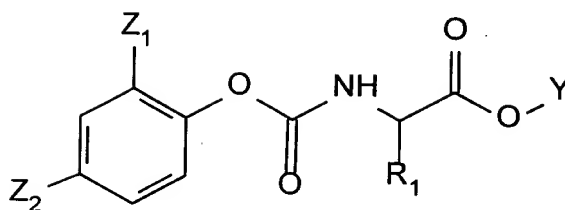


dans laquelle Z<sub>1</sub> et/ou Z<sub>2</sub> = NO<sub>2</sub> R<sub>1</sub> = Phényl, α ou β-Indolyl, 1-Naphtyl ou 2-Naphtyl, R<sub>2</sub> = Me, Et, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> alkyl ou cycloalkyl et x représente un nombre intégral de 1 à 5.

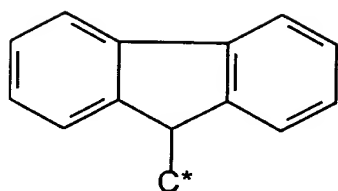
Dans une variante, le substituant par lequel le groupement carboxyle de l'acide est substitué, comprend au moins un chromophore. Par chromophore on entend désigner un groupement fonctionnel qui absorbe du rayonnement électromagnétique. Généralement, le maximum d'absorption des chromophores est de 170 à 2500 nm. De préférence le maximum d'absorption des chromophores est de 200 à 1000 nm. Des exemples de chromophores utilisables sont des systèmes aromatiques, éventuellement substitués en position 2 ou 4 par un substituant -I, -M tel que décrit plus haut. Parmi les substituants comprenant au moins un chromophore, les groupements 4-nitrobenzyl, (2-anthraquinoyl)méthyl et (9(9H-fluorényl)méthyl)) sont particulièrement préférés.

Des variantes préférées du réactif selon l'invention comprenant au moins un chromophore, répondent à la formule générale (II)

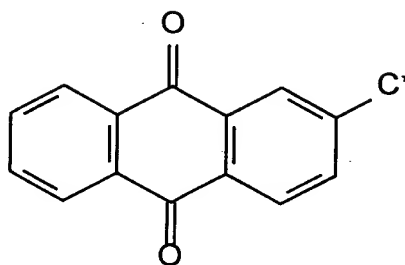
- 6 -



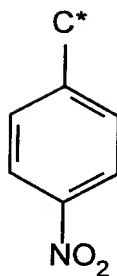
(II)



(III)



(IV)



(V)

dans laquelle  $Z_1$  et/ou  $Z_2 = \text{NO}_2$   $R_1 = \text{Phényl}$ ,  $\alpha$  ou  $\beta$ -Indolyl, 1-Naphtyl ou 2-Naphtyl, et Y correspond à l'une quelconque des formules (III à V), le carbone par lequel Y est lié à l'oxygène du groupement carboxyle de l'acide aminé énantiopur étant marqué par \*.

5 On peut mettre en oeuvre un substituant hydrophile comprenant au moins un chromophore.

Lorsque l'acide aminé énantiopur contient plus d'un groupement carboxyle, on préfère protéger tous les groupements carboxyles. De manière particulièrement préférée, tous les groupements carboxyles sont substitués par un substituant tel que décrit plus haut.

10 Lorsque des groupements fonctionnels libres sont présents dans l'acide aminé énantiopur, on préfère protéger lesdits groupements par des techniques connues en elles.

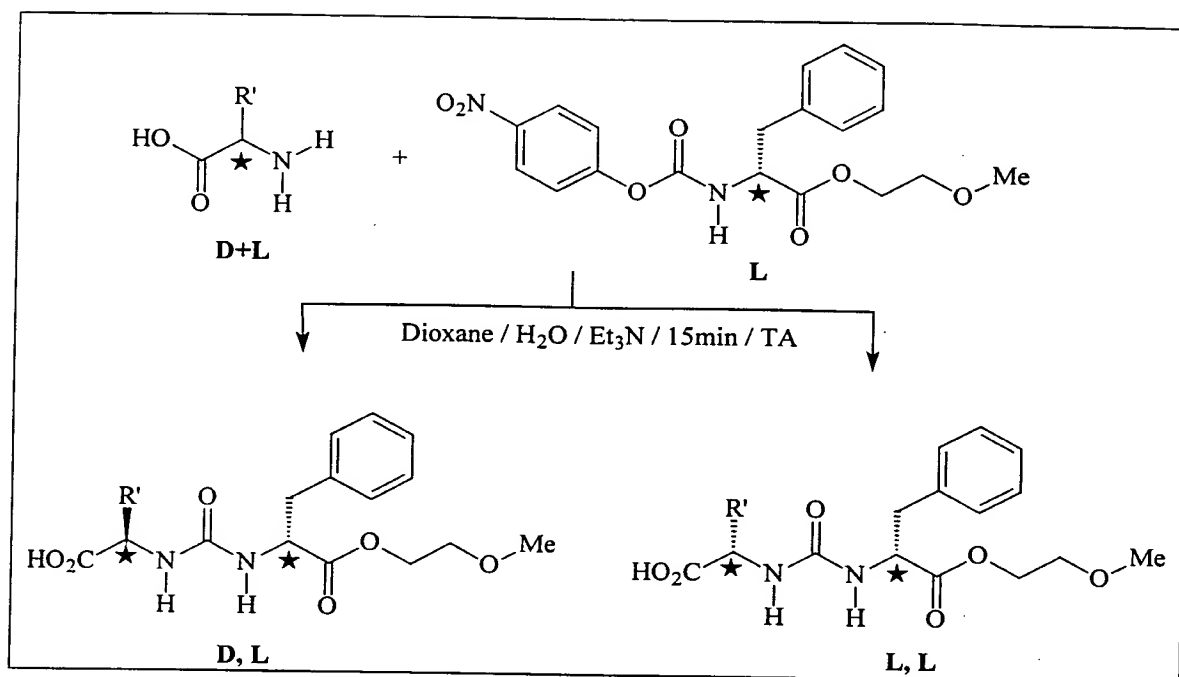
Le réactif selon l'invention peut être obtenu à partir de l'acide aminé énantiopur respectif. Des méthodes connues sont utilisables pour effectuer l'estérification d'au moins un groupement carboxyle de l'acide aminé. On peut, par exemple, mettre en oeuvre l'acide aminé énantiopur et l'alcool correspondant  
5 au substituant à introduire dans un solvant organique tel que par exemple le toluène ou le benzène, en présence d'acide p-toluènesulphonique, de préférence dans des conditions d'estérification azéotropique. Par cette voie de synthèse on obtient des dérivés de tosylate d'ammonium d'ester d'acide aminé, qui conviennent bien pour introduire un groupement activant pour former un  
10 précurseur actif d'un groupement isocyanate.

A titre d'exemple de l'introduction d'un groupement activant, on cite la réaction d'un chlorure d'aryloxy-carbonyl avec le groupement  $-NH_2$ , éventuellement converti en dérivé d'ammonium, d'un acide aminé ou d'un ester d'acide aminé en milieu basique ou neutre dans un solvant organique polaire. A  
15 titre de base conviennent notamment des bases d'amine tertiaires tels que par exemple la triéthylamine ou la pyridine. Quand on travaille en milieu neutre, on préfère mettre en oeuvre de l'hydrogène-carbonate de sodium. Ainsi des bons résultats sont obtenus lorsqu'on fait réagir un tosylate d'ammonium d'ester d'acide aminé avec du chlorure de p-nitrophényloxy-carbonyl en présence  
20 d'hydrogène-carbonate de sodium dans un solvant organique polaire tel que l'acétonitrile.

Dans le procédé selon l'invention on fait réagir le réactif selon l'invention en milieu basique avec un mélange comprenant au moins des énantiomères comprenant au moins un groupement fonctionnel libre.

25 Le schéma 1 ci-après illustre de façon non limitative la réaction d'un réactif selon l'invention, obtenu à partir de l'ester 2-méthoxyéthyl de la L-phénylalanine et du chlorure de (4-nitrophényloxy)formiate avec un acide aminé. Les produits de cette réaction sont des urées comprenant deux acides aminés dans lesquels au moins une fonction carboxyle est substituée avec un substituant.

Schéma 1



Généralement, le groupement fonctionnel libre est un groupement amino, éventuellement monoalkylé, un groupement hydroxyl ou un groupement thiol. Le groupement fonctionnel libre peut également être constitué d'un anion tel que par exemple un carbanion ou un énolate. Les énantiomères comprenant au moins un groupement fonctionnel libre séparables par le procédé selon l'invention sont généralement des aminoacides, des amines primaires ou secondaires, des peptides, des alcools, des hydroxyacides ou des thiols. Le procédé selon l'invention donne de bons résultats pour séparer les énantiomères d'aminoacides tels que, par exemple, les aminoacides d'origine naturelle ou synthétique mentionnés plus haut.

Le procédé selon l'invention donne de bons résultats également pour séparer un mélange d'énantiomères d'iminoacides. Par iminoacide on entend désigner tout composé comprenant au moins un groupement NHR, dans lequel R représente un radical organique tel que par exemple un radical alkyle ou aryle, et au moins un groupement carboxyle. De tels iminoacides sont par exemple ceux appartenant au groupe constitué de Proline, Acide pipécolique (Acide pipéridine-2-carboxylique), Acide morpholine-3-carboxylique, Acide pipérazine-2-

carboxylique, Acide 1-Thia-4-azacyclohexane-3-carboxylique,  $\alpha$ -Méthylproline, Cis-4 -hydroxyproline, Baïkaine (Acide 1,2,3,5-tétrahydropyridine-2-carboxylique), Acide Cis-4 -hydroxypipécolique, Acide Trans-5 -hydroxypipécolique, Acide 1,2,3,4-tetrahydronorharmine-1-carboxylique, Acide 5 1,2,3,4-tétrahydro-6 -hydroxyisoquinoline-3-carboxylique, Acide 1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-3-carboxylique, Acide 1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-1-carboxylique et N-Méthylvaline.

Le procédé selon l'invention est effectué dans un système de solvant, dans lequel le mélange d'énantiomères et le réactif possèdent une solubilité 10 suffisante et le groupement fonctionnel libre possède une nucléophilicité suffisante pour réagir avec un isocyanate. Conviennent, par exemple, à titre de système de solvant des systèmes comprenant au moins un solvant organique polaire et éventuellement de l'eau. Des solvants organiques polaires utilisables sont, par exemple les éthers aliphatiques ou alicycliques tels que le diéthyléther, 15 la tétrahydrofurane ou la 1,4-dioxane ainsi que les esters aliphatiques tels que par exemple l'acétate d'éthyle, les amides secondaires aliphatiques tels que par exemple la diméthylformamide et la diméthylacétamide ou par exemple la N-méthylpyrrolidone ou l'acétonitrile.

De bons résultats pour des composés organiques comprenant un 20 groupement fonctionnel libre tel qu'un groupement amino, éventuellement monoalkylé, un groupement hydroxyl aryle ou un groupement thiol sont obtenus dans un système de solvant comprenant un solvant organique polaire et de l'eau. La dioxane est préférée à titre de solvant organique polaire. Le rapport pondéral entre le solvant organique polaire et l'eau dans le système de solvant est 25 généralement inférieur ou égal à 99 : 1. Le plus souvent, le rapport est inférieur ou égal à 75 : 25. Le rapport est généralement supérieur ou égal à 1 : 99. Le plus souvent, le rapport est supérieur ou égal à 25 : 75.

La quantité du réactif à mettre en oeuvre dépend du nombre de groupements fonctionnels libres dans le composé organique. On met en oeuvre 30 au moins 1 équivalent molaire de réactif par groupement fonctionnel libre. Généralement, on met en oeuvre au plus 10 équivalents molaires de réactif par groupement fonctionnel libre. Le plus souvent, on met en oeuvre au plus 5 équivalents molaires de réactif par groupement fonctionnel libre. De préférence, on met en oeuvre au plus 3 équivalents molaires de réactif par groupement 35 fonctionnel libre. De manière particulièrement préférée, on met en oeuvre de 1,1 à 2,5 équivalents molaires de réactif par groupement fonctionnel libre.

Le caractère basique du milieu réactionnel est généré par des méthodes connues. On travaille, de préférence, en présence d'au moins une base. A titre de base conviennent notamment des bases d'amine tertiaires tels que par exemple la triéthylamine ou la diisopropyléthylamine, qui comprennent une fonctionnalité  
5 basique respectivement ou la N,N,N,N-tétraméthyléthylènediamine qui comprend 2 fonctionnalités basiques.

La quantité de base à mettre en oeuvre dépend de la quantité du réactif et du nombre de fonctionnalités basiques dans la base. Le rapport molaire entre le réactif et les fonctionnalités basiques est généralement d'au moins 1. Le rapport  
10 est généralement d'au plus 2. Un rapport de 1 donne de bons résultats.

Dans le procédé selon l'invention, la durée pendant laquelle on fait réagir le réactif avec le mélange comprenant les énantiomères est généralement inférieure ou égale à 30 min. Le plus souvent, la durée est inférieure ou égale à 20 min. De préférence la durée est inférieure ou égale à 15 min. De bons  
15 résultats sont obtenus avec une durée supérieure ou égale à 15 secondes. En pratique, on applique le plus souvent une durée supérieure ou égale à 1 min. Une durée de 5 à 15 min convient bien.

La température à laquelle on fait réagir le réactif avec le mélange comprenant au moins les énantiomères d'un composé organique est  
20 généralement inférieure ou égale à 35°C. Le plus souvent, la température est inférieure ou égale à 30°C. La température est généralement supérieure ou égale à -20°C. Le plus souvent, la température est supérieure ou égale à 0°C. De façon particulièrement préférée, la température est la température ambiante, c'est-à-dire généralement de 15 à 30°C, de préférence 20 à 25°C.

Dans le procédé selon l'invention, on soumet le mélange de diastéréomères obtenu à une opération de séparation. Les opérations de séparation utilisables pour la séparation d'un mélange de diastéréomères sont décrites par exemple dans E. Eliel, Stereochemistry of Organic compounds, 1994, p.344-381. A titre d'exemple citons les opérations de distillation, de  
30 cristallisation et de chromatographie gazeuse ou liquide. Parmi ces opérations, les opérations de chromatographie liquide telles que par exemple la chromatographie HPLC sont préférées. De façon particulièrement préférée, l'opération de séparation est une chromatographie HPLC-RP (phase inverse). Des informations concernant la chromatographie HPLC sont contenues, par  
35 exemple, dans RÖMPP CHEMIE-LEXIKON, 9. Ed., p.1860-1861. On peut également mettre en oeuvre la chromatographie en couche mince.

Dans une variante du procédé selon l'invention, qui est préférée, on soumet le mélange de diastéréomères obtenu à l'opération de séparation sans épuration préalable. Dans des méthodes de séparation d'énantiomères connues, on isole un mélange brut de diastéréomères qui doit être soumis à une épuration  
5 préalablement à la séparation des diastéréomères. Le procédé et le réactif selon l'invention permettent de ne pas isoler le mélange brut de diastéréomères et d'effectuer l'opération de séparation sans épuration préalable.

Le procédé et le réactif selon l'invention peuvent être utilisés pour la séparation préparative ou analytique d'énantiomères. Le procédé et le réactif  
10 conviennent bien pour la séparation analytique d'énantiomères. Dans une variante, le procédé et le réactif sont utilisés pour déterminer l'excès énantiomérique d'un aminoacide ou d'une amine primaire ou secondaire. Dans une autre variante, le procédé ou le réactif sont utilisés pour déterminer l'excès énantiomérique d'un peptide.

15 Lorsqu'on utilise le procédé ou le réactif selon l'invention pour la séparation analytique d'énantiomères, on met en œuvre une technique de détection connue en elle pour la détermination de la teneur du mélange en énantiomères. Conviennent bien à titre de technique de détection, les techniques optiques telles que par exemple la spectrométrie UV, la spectrométrie visible ou  
20 la fluorimétrie.

Les exemples ci-après entendent illustrer l'invention sans toutefois la limiter.

Exemple 1 (Synthèse du réactif selon l'invention)

Etape A

25 Dans un ballon monocol, on a introduit 1 équivalent d'acide paratoluène sulfonique monohydrate, 50 équivalents de toluène PA et 5 équivalents de Méthoxyéthanol. Le mélange a été chauffé au reflux et l'eau a été éliminée au moyen d'un Dean-Stark. Après 4 heures de reflux, le mélange réactionnel a été refroidi à température ambiante et  
30 dilué par de l'éther éthylique. Le mélange réactionnel dilué a été placé au frigo pendant 16 heures. Le solide blanc obtenu a été filtré, lavé à l'éther et séché sous vide.

Etape B

35 Dans un ballon monocol, on a pesé du  $\text{NaHCO}_3$  (2.6 équivalents) et on a introduit sous courant d'azote l'acétonitrile ( $5 \cdot 10^{-3}$  mole dans 36ml). Le mélange a été refroidi à  $0^\circ\text{C}$  et on a introduit successivement du (4-

nitrophényloxy)chloroformate (1 équivalent) suivi du sel d'ammonium de l'acide aminé énantiopur obtenu selon exemple 1, étape A (1 équivalent). Le mélange a été agité vigoureusement 1 heure à 0°C et a été ensuite remonté à température ambiante pendant 4 heures. Ce temps écoulé, le mélange a été transféré dans une ampoule à décanter, a été dilué par une solution 1 molaire d'HCl et extrait trois fois à l'éther. Les phases organiques combinées ont été séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et concentrées sous pression réduite. Le produit brut a été soumis à un traitement d'épuration approprié.

#### Exemple 2

On a effectué les étapes A et B en mettant en œuvre la L-phénylalanine à titre d'acide aminé énantiopur. Le produit brut a été recristallisé dans l'isopropanol jusqu'à l'obtention de la pureté désirée. Le rendement de l'étape B a été 64%. On a obtenu un solide cristallin qui était stable au stockage à température ambiante.

Le réactif ainsi obtenu a présenté les données analytiques suivantes :

RMN (H<sup>1</sup>) : (référence Dioxanne à 3,71ppm; produit dissous dans le dioxanne-d<sub>6</sub>)

8,40 (2H, d) : 2H du (4-nitrophényloxy)carbonyl

7,44 (7H, m) : 2H du (4-nitrophényloxy)carbonyl et 5H du phényle

7,31 (1H, d) : NH du carbamate

4,83 (1H, m) : CH de la Phénylalanine

4,41 (2H, m) : CH<sub>2</sub>OC=O

3,70 (2H, m) : CH<sub>2</sub>OMe

3,47 (3H, s) : CH<sub>3</sub>O

3,27 (2H, AB) : 2H benzyliques

La Résonance magnétique nucléaire (RMN) a été effectuée, dans tous les cas pour lesquels un spectre RMN est indiqué, avec un spectromètre Appareil Brücker AMX 500 MHz. Les déplacements chimiques sont indiqués en ppm par rapport à la résonance du TMS (tétraméthylsilane). Pour les allures des résonances les abbreviations suivantes sont utilisées: m=multiplet, s=singulet, d=doublet, t=triplet, q=quadruplet. Le nombre nH indique le nombre de protons correspondant au signal.

Point de fusion : 71-72°C

Rotation optique :  $[\alpha]$  : + 42,608 (c=0,86 gr/100ml dans le dioxanne; T° = 26°C,  $\lambda$  = 589nm)

La chromatographie en couche mince (CCM) a été effectuée en utilisant des plaques de silicagel MERCK® 60F-254. Rapport frontal = 0,45 (Eluant Diéthyléther/Ether de pétrole : mélange 75/25 en volume).

Exemples 3-48 (Dérivatisation et séparation de mélanges d'énantiomères)

- 5 Dans un vial de 10ml, on a pesé précisément le mélange d'énantiomères d'un composé organique comprenant au moins un groupement fonctionnel libre selon les exemples 3-59 (voir tableau) (1 équivalent) que l'on a dissout dans de l'eau distillée (concentration  $5.10^{-3}$  mol/l) en présence de triéthylamine. Le rapport molaire de la triéthylamine par rapport au réactif a été 1. Dans un second
- 10 vial de 10ml, on a introduit le réactif obtenu selon l'exemple 1 dans lequel l'acide aminé était la L-phénylalanine. Le réactif a été dissout dans du dioxanne de pureté analytique (concentration  $3.10^{-2}$  mol/l). On a transféré via seringue, et sous agitation vigoureuse, la solution aqueuse de l'acide aminé dans la solution du réactif de dérivation. Après 15 minutes d'agitation à
- 15 température ambiante, on a prélevé 500µl du mélange réactionnel que l'on a dilué par 500µl de dioxanne. Cette solution a été analysée par HPLC en phase inverse par injection de 10µl de solution sur une colonne VYDAC®.

Les suivantes conditions standards ont été utilisées pour les exemples de séparation de mélanges d'énantiomères par HPLC.

- 20 On a utilisé une colonne VYDAC® Reverse Phase C18 CAT 201TP54.
- On a employé pour l'élution un mélange Acétonitrile / H<sub>2</sub>O avec un gradient en acétonitrile de 1.58% / min en présence de 0.1% en volume de l'acide trifluoroacétique.

La détection a été effectuée par spectrométrie UV à 205 et 220 nm.

- 25 Le tableau 1 ci-après rassemble les mélanges d'énantiomères qui ont été mis en oeuvre avec le réactif obtenu selon l'exemple 1 et les résultats de séparation obtenus.

Tableau 1

Ex.	Mélange d'énantiomères	Tr L,L <sup>(a)</sup>	Tr D,L <sup>(b)</sup>	$\alpha$ <sup>(c)</sup>	Rs <sup>(d)</sup>	Quantité de réactif <sup>(e)</sup> (Equivalents)
3	Alanine	15.08	16.40	1.096	6.01	2
4	Valine	18.73	20.94	1.127	10.83	2
5	Norvaline	19.28	21.26	1.11	9.45	2
6	Leucine	21.53	23.50	1.098	8.96	2
7	Norleucine	22.06	23.96	1.091	8.78	2

8	Isoleucine	21.08	23.46	1.120	11.55	2
9	Thréonine	14.39	15.41	1.078	4.76	2
10	Allothréonine	14.39	14.85	1.036	2.09	2
11	Méthionine	18.97	20.59	1.092	7.74	2
12	Ethionine	21.26	22.89	1.082	7.77	2
13	Acide Glutamique	14.56	15.00	1.033	2.07	2
14	Acide Aspartique	14.22	14.66	1.034	2.08	2
15	Cystéine	26.65	27.19	1.021	2.85	5*
16	Cystine	25.59	26.08	1.020	2.76	4*
17	Proline	17.09	17.75	1.042	2.75	2
18	Phénylalanine	22.64	24.08	1.068	6.25	2
19	Tyrosine	28.82	29.24	1.015	1.99	5*
20	Tryptophane	22.79	24.03	1.058	6.54	2
21	Ornithine	24.44	24.92	1.021	2.26	6*
22	Acide pipéridine- 2-carboxylique (Acide pipécolique)	19.86	20.62	1.041	3.51	2
23	Acide morpholine-3- carboxylique	16.05	15.56	1.034	2.28	2
24	Acide 1-Thia-4- azacyclohexane- 3-carboxylique	18.76	19.43	1.038	3.30	2
25	(2-Naphtyl) alanine	27.43	28.53	1.042	5.19	2
26	Homophényl- alanine	24.71	26.20	1.064	7.94	2
27	(4-Chlorophényl) alanine	25.91	27.20	1.053	5.58	2
28	(4-Fluorophényl) Alanine	23.65	25.033	1.062	6.53	2
29	(3-Pyridyl)alanine	13.57	14.32	1.061	3.20	2
30	Phénylglycine	20.98	22.69	1.087	8.24	2
31	2-Méthylproline	19.29	20.55	1.07	5.76	2

32	Cis-4-Hydroxyproline	13.92	14.44	1.041	2.19	2
33	Baïkaine	19.05	20.27	1.069	6.03	2
34	Acide Cis-4-hydroxy pipécolique	15.12	15.91	1.058	3.97	2
35	Acide Trans-5-hydroxy pipécolique	13.76	14.36	1.049	2.70	2
36	Acide 2-amino-butyrique	16.84	18.64	1.116	8.31	2
37	Acide 1,2,3,4-tétrahydro-isoquinoline-3-carboxylique	23.71	24.75	1.046	4.89	2
38	Acide 1,2,3,4-tétrahydro-isoquinoline-1-carboxylique	23.66	24.67	1.045	4.75	2
39	Erythro $\beta$ -Méthyl phenylalanine	24.03	25.73	1.075	8.67	2
40	Threo $\beta$ -Méthyl phenylalanine	23.79	25.56	1.079	7.22	2
41	o-Methoxy-Phenylalanine	23.08	24.31	1.057	5.64	2
42	Acide 1,2,3,4-tetrahydronorharmane-1-carboxylique	26.26	27.09	1.031	3.44	5*

43	Acide 1,2,3,4-tétrahydro-6-hydroxy isoquinoline-3-carboxylique	29.14	29.67	1.019	2.49	5*
44	Acide 2-amino heptane 1,7dioïque	18.09	19.21	1.067	6.41	2
45	Erythro β-Méthyltyrosine	29.84	30.53	1.024	3.65	5*
46	Threo β-Méthyltyrosine	29.51	30.07	1.02	2.97	5*
47	N-Méthylvaline	21.47	22.59	1.056	5.62	2
48	2-Hydroxyméthyl pipéridine	19.79	20.4	1.033	2.73	2

(a): Temps de rétention correspondant au dérivé de l'énantiomère L (L,L)

(b): Temps de rétention correspondant au dérivé de l'énantiomère D (D,L)

(c): Facteur de séparation ;  $\alpha = (Tr_2 - Tr_0) / (Tr_1 - Tr_0)$  où  $Tr_2$  et  $Tr_1$  sont les temps de rétention respectivement des deuxième et premier composé et  $Tr_0$  est le temps de rétention d'un composé non retenu.

5

(d): Facteur de résolution;

$$R_s = 0.25 \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k'_2}{1 + k'_2} \right) \sqrt{N_2}$$

où  $k'_2$  est le facteur de capacité du second composé et  $N$  le nombre de plateaux théoriques.

\*Dérivatisation également de la fonction portée par la chaîne latérale.

#### 10 Exemple 49

On a effectué les étapes A et B en mettant en œuvre la L-(2-naphtyl)alanine à titre d'acide aminé énantio-pur. Le produit brut a été recristallisé dans l'isopropanol jusqu'à l'obtention de la pureté désirée. Le rendement de l'étape B a été 77%. On a obtenu un solide cristallin qui était stable au stockage à

15

température ambiante.

On a obtenu le spectre RMN suivant du réactif :

RMN (H1): (référence Dioxanne à 3,71ppm; produit dissous dans le dioxanne-d6)

8,20 (2H, d) : 2H du (4-nitrophényloxy)carbonyl

7,79 (4H, m) : 4H du naphtyl

- 7,45 (3H, m) : 3H du naphthyl  
 7,21 (3H, m) : 2H du (4-nitrophényloxy)carbonyl et 1H du naphthyl  
 4,78 (1H, m) : CH du Naphtylalanine  
 4,27 (2H, m) : CH<sub>2</sub>OC=O  
 5 3,52 (2H, m) : CH<sub>2</sub>OMe  
 3,28 (3H, s) : CH<sub>3</sub>O  
 3,29 (2H, AB) : 2H benzyliques

Point de fusion : 76-77°C

Rotation optique :  $[\alpha]$  : 83,5 (c = 1,025 gr/100ml dans le dioxanne;  
 T° = 26°C,  $\lambda$  = 589nm)

- La chromatographie en couche mince (CCM) a été effectuée en utilisant des plaques de silicagel MERCK® 60F-254. Rapport frontal = 0,4 (Eluant  
 10 Diéthyléther/Ether de pétrole : mélange 75/25 en volume).

- On a effectué la réaction de l'ester 2-méthoxyéthyl de la L-N-(4-nitrophényloxy)carbonyl-(2-naphtyl)alanine avec un mélange d'énantiomères d'arginine et l'opération de séparation dans les conditions des exemples 3-48. On a mis en œuvre 2 équivalents de réactif et 2 équivalents de triéthylamine par  
 15 équivalent d'arginine.

Le tableau 2 ci-après montre le résultat de séparation obtenu.

Tableau 2

Exemple	Mélange d'énantiomères	Tr L,L <sup>(a)</sup>	Tr D,L <sup>(b)</sup>	$\alpha$ <sup>(c)</sup>	Rs <sup>(D)</sup>	Quantité de réactif <sup>(e)</sup> (Equivalents)
49	Arginine	19.625	20.168	1.030	1.73	2

#### Exemple 50

- On a effectué la réaction de l'ester 2-méthoxyéthyl de la L-N-(4-nitrophényloxy)carbonyl- $\beta$ -tryptophane avec un mélange d'énantiomères de valine et l'opération de séparation dans les conditions des exemples 3-48. On a mis en œuvre 2 équivalents de réactif et 2 équivalents de triéthylamine par  
 20 équivalent de valine.

Le tableau 3 ci-après montre le résultat de séparation obtenu.

- 25 Tableau 3

Exemple	Mélange d'énantiomères	Tr L,L <sup>(a)</sup>	Tr D,L <sup>(b)</sup>	$\alpha$ <sup>(c)</sup>	Rs <sup>(D)</sup>	Quantité de réactif <sup>(e)</sup> (Equivalents)
50	Valine	19.520	20.762	1.030	1.73	2

Exemple 51 : Préparation de l'ester 4-nitrobenzyle de la N-((4-nitrophényloxy)carbonyl de phenylalanine)

Etape A :

Dans un ballon monocol, on a introduit 4 gr (1 éq.) de Z-(L)-Phénylalanine, 2,89 gr (1 éq.) de bromure de 4-nitrobenzyle et 26 ml (25 éq.) de diméthylformamide. On a additionné alors sous azote 1.55 gr (2éq.) de fluorure de potassium sec. Le mélange a été agité à 60°C pendant 16 heures. Le mélange réactionnel a été refroidi à température ambiante et dilué par 100 ml d'acétate d'éthyle. La phase organique a été lavée par deux fois 100 ml d'une solution de NaHCO<sub>3</sub> à 5% ainsi que par deux fois 100 ml d'eau. La phase organique a été séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et concentrée sous pression réduite. Le solide obtenu a été séché à l'étuve une nuit.

Rendement : 6,3 gr (85%)

Etape B :

Le solide obtenu dans l'étape 1 a été dilué dans 25 ml d'acide acétique glacial. On a ajouté prudemment 6,9 ml (3éq.) d'une solution à 33% en poids d'HBr dans l'acide acétique. Le mélange est agité une heure et demi à température ambiante. Le mélange a été dilué par 200 ml d'éther éthylique et le précipité blanc formé a été filtré et lavé par trois fois 200 ml d'éther éthylique. Le solide a été séché à l'étuve pendant une nuit.

Rendement : 5,53 gr (99%)

Etape C :

Dans un ballon monocol, on a pesé 0,82 gr de NaHCO<sub>3</sub> (2,6 éq.) et on a introduit sous courant d'azote 27 ml d'acétonitrile (135 éq.). Le mélange a été refroidi à 0°C et on a introduit successivement 0,81 gr (1 éq.) de chlorure de (4-nitrophényloxy)carbonyl suivi de 1,5 gr (1 éq.) du sel de brome du dérivé de la phénylalanine-4-nitrobenzyle. Le mélange a été agité vigoureusement 1 heure à 0°C et a été ensuite remonté à température ambiante pendant 11 heures. Ce temps écoulé, le mélange a été transféré dans une ampoule à décànter, a été dilué par 60 ml d'une solution 1M d'acide chlorhydrique et a été extrait par trois fois 60 ml d'acétate d'éthyle. Les phases organiques combinées ont été séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et concentrées sous pression réduite pour donner un solide beige. Celui-ci a été trituré dans 50 ml d'éther et filtré.

Rendement : 1,44 gr (82%)

RMN (H1): (référence Méthanol à 3,32 ppm; produit dissous dans le Méthanol-d4)

- 8,32 (2H, d) : 2H du 4-nitrophenoxy-carbonyl  
 8,28 (2H, d) : 2H du 4-nitrobenzyle  
 7,63 (2H, d) : 2H du 4-nitrophenoxy-carbonyl  
 7,34-7,41 (7H, m) : 2H du 4-nitrobenzyle et 5H du phényl  
 5,37 (2H, s) : CH<sub>2</sub> benzylique du 4-nitrobenzyle  
 4,65 (1H, m) : CH de la Phénylalanine  
 3,23 (2H, AB) : CH<sub>2</sub> benzyliques de la phénylalanine

Point de fusion : 118,3°C

Rotation optique :  $[\alpha]$  : +20,83 (c = 0.96 gr/100ml dans le dioxanne;  
 T° = 24°C,  $\lambda$  = 589nm)

La chromatographie en couche mince (CCM) a été effectuée en utilisant des plaques de silicagel MERCK® 60F-254. Rapport frontal = 0,4 (Eluant Diéthyléther/Ether de pétrole : mélange 75/25 en volume).

Exemple 52

Le tableau 4 présente le résultat de séparation d'un mélange d'énantiomères de valine qui a été mis en œuvre avec le réactif obtenu selon l'exemple 51 selon le mode opératoire de l'exemple 3.

La détection a été effectuée par spectrométrie UV à 205, 220 et 270 nm.

**Tableau 4**

Ex.	Mélange d'énantiomères	Tr L,L (a)	Tr D,L (b)	$\alpha$ <sup>(c)</sup>	Rs <sup>(d)</sup> (nm)	Equivalents de réactifs	Rs (nm)
52	Valine	26.207	27.246	1.042	3.92 (205nm)	2	4.77 (220 - 270)

On a observé que ce réactif permet une détection à 220 nm et 270 nm. On a obtenu, à ces longueurs d'ondes, un facteur de séparation plus grand que lorsqu'on a effectué la détection à 205nm.

Exemple 53

On a synthétisé suivant le mode opératoire de l'exemple 51, l'ester 2-méthylanthraquinone de la N-((4-nitrophényloxy)carbonyl)phénylalanine. Le tableau 5 présente le résultat de séparation d'un mélange d'énantiomères de valine qui a été mis en œuvre avec le réactif obtenu selon l'exemple 51 selon le mode opératoire de l'exemple 3.

La détection a été effectuée par spectrométrie UV à 205, 220, 270 et 330 nm.

**Tableau 5**

Ex.	Mélange d'énantiomères	Tr L,L (a)	Tr D,L (b)	$\alpha$ <sup>(c)</sup>	Rs <sup>(d)</sup> (nm)	Equivalents de réactifs	Rs (nm)
53	Valine	30.168	30.884	1.025	3.01 (205nm)	2	3.11 (270 et 330)

On a observé que ce réactif permet une détection à 270 nm et 330 nm. On a obtenu, à ces longueurs d'ondes, un facteur de séparation légèrement plus grand que lorsqu'on a effectué la détection à 205nm.

- 5 Il apparaît que le réactif selon l'invention peut être obtenu facilement. Le réactif selon l'invention présente une bonne stabilité à température ambiante.

Le procédé selon l'invention permet de séparer une grande variété de composés organiques chiraux comprenant au moins un groupement fonctionnel libre, de manière simple, rapide et dans des conditions uniformes de séparation sans devoir isoler le produit de la réaction préalablement à l'étape de séparation.

REVENDICATIONS

1 - Procédé pour la séparation d'énantiomères comprenant au moins un groupement fonctionnel libre dans lequel

- 5 (a) on fait réagir un mélange comprenant les énantiomères en milieu basique avec un réactif à base d'un aminoacide énantio pur, réactif dans lequel au moins un groupement amino de l'acide porte un groupement activant pour former un précurseur actif d'un groupement isocyanate et dans lequel au moins un groupement carboxyle de l'acide est substitué et
- 10 (b) on soumet le mélange de diastéréomères obtenu à une opération de séparation.

2 - Procédé selon la revendication 1, dans lequel le groupement carboxyle de l'acide est substitué avec un substituant hydrophile et/ou un substituant comprenant au moins un chromophore.

3 - Procédé selon la revendication 2 dans lequel le substituant hydrophile dans le réactif est un groupement 2-méthoxyéthyl.

15

4 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel le groupement activant dans le réactif est un groupement (4-nitrophényloxy)carbonyl.

5 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel le réactif est à base d'un aminoacide énantio pur sélectionné parmi le groupe constitué de Alanine, Valine, Norvaline, Leucine, Norleucine, Isoleucine, Sérine, Isosérine, Homosérine, Thréonine, Allothréonine, Méthionine, Ethionine, Acide Glutamique, Acide Aspartique, Asparagine, Cystéine, Cystine, Phénylalanine, Tyrosine, Tryptophane, Lysine, Arginine, Histidine, Ornithine, Glutamine, Citrulline, (1-Naphtyl)alanine, (2-Naphtyl)alanine, Homophénylalanine, (4-Chlorophényl)alanine, (4-Fluorophényl)alanine, (3-Pyridyl)alanine, Phénylglycine, Acide Diaminopimélique (Acide 2-6-Diaminoheptane-1,7-dioïque), Acide 2-aminobutyrique, Acide-2-aminotétraline-2-carboxylique, Erythro  $\beta$ -Méthylphénylalanine, Threo  $\beta$ -Méthylphénylalanine, (2-Méthoxyphényl)alanine, Acide 1-amino-5-hydroxyindane-2-carboxylique, Acide 2-Aminoheptane-1,7-dioïque, (2,6-Diméthyl-4-hydroxyphényl)alanine, Erythro  $\beta$ -Méthyltyrosine et Threo  $\beta$ -Méthyltyrosine.

20

25

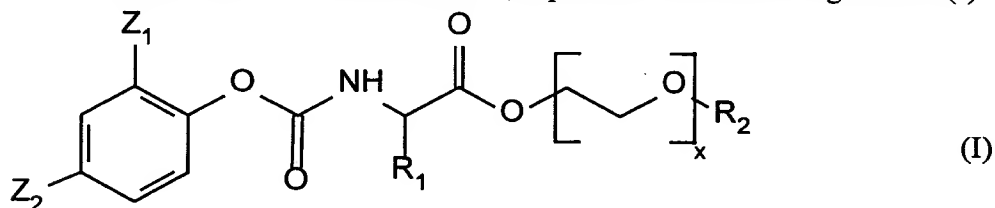
30

6 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 dans lequel on fait réagir le mélange d'énantiomères avec le réactif à température ambiante pendant une durée inférieure ou égale à 15 minutes et on soumet le mélange de diastéréomères obtenu à l'opération de séparation sans épuration préalable.

5 7 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel l'opération de séparation est une chromatographie HPLC.

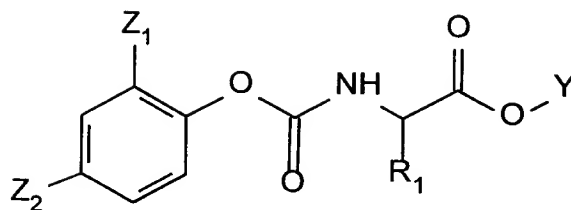
8 - Réactif à base d'un aminoacide énantipur dans lequel au moins un groupement amino de l'acide porte un groupement activant pour former un précurseur actif d'un groupement isocyanate et dans lequel au moins un  
10 groupement carboxyle de l'acide est substitué.

9 - Réactif selon la revendication 8, répondant à la formule générale (I)

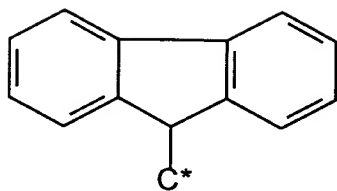


dans laquelle  $Z_1$  et/ou  $Z_2 = \text{NO}_2$   $R_1 = \text{Phényl}$ ,  $\alpha$  ou  $\beta$ -Indolyl, 1-Naphtyl ou 2-Naphtyl,  $R_2 = \text{Me}$ , Et, C3-C6 alkyl ou cycloalkyl et  $x$  représente un nombre intégral de 1 à 5.

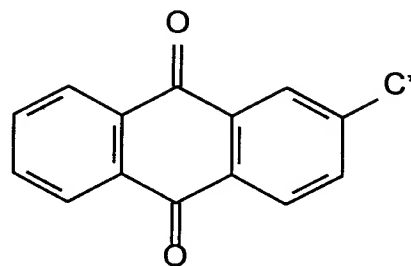
15 10 - Réactif selon la revendication 8 comprenant au moins un chromophore, répondant à la formule générale (II)



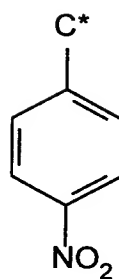
(II)



(III)



(IV)



(V)

dans laquelle  $Z_1$  et/ou  $Z_2 = \text{NO}_2$   $R_1 = \text{Phényl}$ ,  $\alpha$  ou  $\beta$ -Indolyl, 1-Naphtyl ou 2-Naphtyl, et Y correspond à l'une quelconque des formules III à V, le carbone par lequel Y est lié à l'oxygène du groupement carboxyle de l'acide aminé étant marqué par \*.

- 5 11 - Utilisation du procédé ou du réactif selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 pour l'analyse de l'excès énantiomérique d'un acide aminé, d'une amine primaire ou secondaire ou d'un peptide.